

EUR 3270.d

LIBRARY COPY

ASSOZIATION

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT — EURATOM
GESELLSCHAFT FÜR STRAHLENFORSCHUNG mbH

**PATHOGENESE GENETISCHER
UND SOMATISCHER STRAHLENSCHÄDEN**

Jahresbericht 1965

1967



Bericht abgefaßt beim
Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlenforschung mbH,
Neuherberg/München - Deutschland

Assoziation Nr. 045-65-1 BIAD

HINWEIS

Das vorliegende Dokument ist im Rahmen des Forschungsprogramms der Kommission der Europäischen Atomgemeinschaft (EURATOM) ausgearbeitet worden.

Es wird darauf hingewiesen, daß die Euratomkommission, ihre Vertragspartner und die in deren Namen handelnden Personen :

keine Gewähr dafür übernehmen, daß die in diesem Dokument enthaltenen Informationen richtig und vollständig sind, oder daß die Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen, oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden und Verfahren nicht gegen gewerbliche Schutzrechte verstößt;

keine Haftung für die Schäden übernehmen, die infolge der Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen, oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden oder Verfahren entstehen könnten.

Dieser Bericht wird in den auf der vierten Umschlagseite genannten Vertriebsstellen

zum Preise von DM 4.—	FF 5.—	FB 50	Lit. 620	Fl. 3.60
-----------------------	--------	-------	----------	----------

verkauft.

Es wird gebeten, bei Bestellungen die EUR-Nummer und den Titel anzugeben, die auf dem Umschlag jedes Berichts aufgeführt sind.

Gedruckt von Van Muysewinkel,
Brüssel, Februar 1967

Das vorliegende Dokument wurde an Hand des besten Abdruckes vervielfältigt, der zur Verfügung stand.

EUR 3270 . d

ASSOZIATION
EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT — EURATOM
GESELLSCHAFT FÜR STRAHLENFORSCHUNG mbH

**PATHOGENESE GENETISCHER
UND SOMATISCHER STRAHLENSCHÄDEN**

Jahresbericht 1965

1967



Bericht abgefaßt beim
Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlenforschung mbH,
Neuherberg/München - Deutschland

Assoziation Nr. 045-65-1 BIAD

Zusammenfassung

Gegenstand des Forschungsprogramms sind experimentelle Studien über die Häufigkeit und die Entstehungsweise der durch ionisierende Strahlen hervorgerufenen somatischen Spätschäden und genetischen Schäden bei Tieren. Die Untersuchungen sollen die wissenschaftlichen Erfahrungen erweitern, die für die Abschätzung des Strahlenrisikos bei Bestrahlung von aussen und bei Inkorporation radioaktiver Nuklide nötig sind. Insbesondere soll auch versucht werden, Aufschlüsse über die Wirkung schwacher Strahlendosen zu gewinnen.

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
Vorbemerkungen	4
Gesamtprogramm	5
1. Strahlen-genetik der Wirbeltiere	6
1.1 Die strahleninduzierten dominanten Letalmutationen in den männlichen Keimzellen der Maus	6
1.2 Strahlen-genetische Studien an Fischen	9
1.21 Vorversuche zur Bestimmung der akuten Letalität nach Ganzkörperbestrahlung	9
1.22 Bestimmung rezessiver Mutationen nach Bestrahlung	10
1.23 Mutationen spezifischer Loci	12
1.24 Mutationen polygener Faktoren	12
2. Funktionsstörungen des Nervensystems nach Bestrahlung	14
2.1 Aufbau einer universellen, neurophysiologischen Messeinheit	16
2.2 Verhaltensforschung	17
2.3 Vorbereitende embryologische Studien	17
3. Studien zur Pathogenese akuter und chronischer Strahlenschäden im Säugetierorganismus	19
3.1 Strahlenphysikalische, metabolische und toxi-kologische Studien mit Radium 224 (Thorium X)	20
3.11 Strahlenphysikalische, metabolische und toxi-kologische Studien	20
3.12 Ausscheidung und Retention von Radium 224 und Tochterprodukten bei Ratten	21
3.13 Organverteilung	21
3.14 Skelettdosisberechnungen	22
3.2 Pathologische und histochemische Studien	23
3.21 Methodische Untersuchungen	23
3.22 Morphologische und histochemische Studien zur akuten Toxizität nach Inkorporation von Radium 224 (Thorium X)	24
3.23 Untersuchungen zur Pathogenese und Histochemie von Strahlenschäden nach Röntgenbestrahlung	26
3.231 Lokale Röntgenbestrahlung des Kniegelenks wachsen-der Ratten	26
3.232 Verhalten der alkalischen Phosphatase in der Dün-n-darmschleimhaut der Maus nach Röntgenbestrahlung	27
3.233 Einfluß einer Ganzkörperbestrahlung (LD 50) auf die Enzymmuster der Milz bei verschiedenen Spezies	30

V o r b e m e r k u n g e n (*)

Der Vertrag wurde im März 1965 mit Rückwirkung vom 1.1.1965 geschlossen.

Mitglieder des Lenkungsausschusses:

Dr. APPLEYARD	EURATOM	Vorsitzender
Dr. WITTENZELLNER	GSF	Stellv. Vorsitzender
Dr. ELLERKMANN	EURATOM	
Dr. EBERT	EURATOM	
Herr LOOSCH	BMwF	
Prof. Dr. WACHSMANN	GSF	

Das Forschungsprogramm wird am Institut für Biologie der Gesellschaft unter Beteiligung folgender Wissenschaftler durchgeführt:

Prof.Dr. O. HUG	(wissenschaftlicher Leiter des Programms)
Prof.Dr. W. GÖSSNER	(EURATOM; Leiter der pathologisch-anatomischen Arbeiten, zugleich stellvertretender wissenschaftlicher Leiter)
Dr. M. BORNHAUSEN	(Verhaltensforschung)
Dr. Th. von KREYBIG	(Embryologie)
Dr. A. LUZ	(Pathologie)
Dr. A. NACIMIENTO	(Neurophysiologie)
Dr. W. RUMMEL	(Pathologie)
Dr. H. SCHRÖDER	(Genetik)

Ferner arbeiteten an dem Programm experimentell und beratend mit:

Dipl.Phys. O. BALK (Strahlenphysik), Dr. W. MÜLLER (Strahlenphysik und Isotopenforschung), Dr. M. NÜSSEL (Veterinärpathologie) und Frau I. ZELLER (Veterinärmedizin).

Die ersten Monate des Berichtsjahres waren dem Ausbau der Einrichtung und der Anpassung der Laboratorien an das Forschungsprogramm und der Gewinnung und Einarbeitung neuer

(*) Manuskript erhalten am 19. Dezember 1966.

Mitarbeiter für das Forschungsprogramm gewidmet. Die Tierzucht wurde entsprechend dem Programm erweitert. Die neu eingerichteten Laboratorien für allgemeine und experimentelle Pathologie einschließlich der Histochemie wurden in Betrieb genommen; die Isotopenabteilung durch zusätzliche Meßgeräte ergänzt. Mit dem Aufbau des elektrophysiologischen Meßplatzes wurde im Mai 1965 begonnen.

G e s a m t p r o g r a m m

Gegenstand des Forschungsprogrammes sind experimentelle Studien über die Häufigkeit und die Entstehungsweise der durch ionisierende Strahlen hervorgerufenen somatischen Spätschäden und genetischen Schäden bei Tieren. Die Untersuchungen sollen die wissenschaftlichen Erfahrungen erweitern, die für die Abschätzung des Strahlenrisikos bei Bestrahlung von außen und bei Inkorporation radioaktiver Nuklide nötig sind. Insbesondere soll auch versucht werden, Aufschlüsse über die Wirkung schwacher Strahlendosen zu gewinnen. Statistische Erhebungen über die Häufigkeit von Strahlenschäden in bestrahlten Tiergruppen können im allgemeinen nur Aufschluß über die Wirkung relativ großer Strahlendosen geben, da der Zahl der Versuchstiere technische Grenzen gesetzt sind. Somit müssen die statistischen Untersuchungen durch Studien über die Entstehungsweise der verschiedenen Formen von Strahlenschäden ergänzt werden. Ein besseres Verständnis der Pathogenese erlaubt dann Rückschlüsse auf die Wirkung kleiner Strahlendosen. Besondere Beachtung soll der Rolle der zeitlichen und räumlichen Dosisverteilung bei der Strahlenwirkung nach Inkorporation radioaktiver Nuklide gewidmet werden.

1. Strahlengenetik der Wirbeltiere

Ziel dieser Untersuchungen ist es, teils mit bewährten, teils mit neuentwickelten genetischen Methoden weitere quantitative Aufschlüsse über die mutagene Wirkung ionisierender Strahlen bei solchen Vertretern der Wirbeltiere zu gewinnen, die einerseits in der Vertebratenevolution Gruppen mit hohem (Fische) und solche mit geringem (Säuger) phylogenetischen Alter repräsentieren, andererseits aber aufgrund rascher Generationsfolge und hoher Nachkommenzahlen statistisch befriedigende Testungen erlauben.

Insbesondere soll für verschiedene genetische Effekte die Abhängigkeit von der Dosis und Dosisleistung untersucht werden, um dadurch Einblicke in die biophysikalischen Wirkungsmechanismen zu gewinnen und unsere Vorstellungen über das genetische Strahlenrisiko zu verbessern. Neben Mutationen an spezifischen Loci und letalen Mutationen interessiert die Strahlenwirkung auf polygene Faktoren, die möglicherweise für die Abschätzung des genetischen Risikos von besonderer Bedeutung ist, aber noch kaum quantitativ bearbeitet wurde.

1.1 Die strahleninduzierten dominanten Letalmutationen in den männlichen Keimzellen der Maus

Nach einer mit geringen Modifikationen von zahlreichen Genetikern (RUSSELL et al., LÜNING, BATEMAN, etc.) angewandten und in unserem Institut früher von U. EHLING routinemäßig ausgebauten Methode wurden die Fertilität, die Zahl der Corpora lutea, die Verluste von Embryonen vor und nach Implantation in Weibchen nach Paarung mit unbestrahlten Männchen bestimmt.

Hybride F_1 -Männchen (insgesamt 308 Tiere) aus den Mäusestämmen 101 φ x C3H σ im Alter von 10 - 12 Wochen wurden in Gruppen eingeteilt und total oder nur in der Hodenregion röntgenbestrahlt (Erzeugungsspannung 300 kV, Filterung

0,6 mm Kupfer und 1,0 mm Aluminium, Stromstärke 10 mA, Fokus-Objekt-Abstand 55,5 cm, Dosisleistung 55 R/min.). In allen Fällen wurden vor der Bestrahlung die Hoden durch vorsichtige Manipulation in den Hodensack verlagert und dort für die Dauer der Bestrahlung mit einem Gummiband fixiert. Die Tiere wurden zur Bestrahlung in einen scheibenförmigen Plastikbehälter radial zum Mittelpunkt des Bestrahlungsfeldes angeordnet und fixiert. Zur Teilbestrahlung wurden die Tierkörper vom Kopf bis zur Beckenregion mit einer Ringscheibe aus Blei abgedeckt, so daß nur das caudale Rumpfende mit dem im Scrotum fixierten Hoden in einer Länge von 10 - 12 mm direkt bestrahlt wurde. Die Strahlendosis wurde mit einer zwischen den Tieren liegenden Ionisationskammer und mit einer zweiten kleinen Fingerhutkammer, die dicht am distalen Ende eines mitbestrahlten toten Tieres lag, und stichprobenweise durch kleine in der Hodengegend fixierte Gewebsdosimeter (Lithium-fluorid in Plastikröhrchen) gemessen. Bestrahlte und als Kontrolle dienende unbestrahlte Männchen wurden mit unbestrahlten Weibchen gleicher Abkunft und gleichen Alters gepaart, indem je ein Männchen für jede der aufeinanderfolgenden Wochen mit je zwei Weibchen zusammengesetzt wurde. 13,5 bis 16,5 Tage nach der Konzeption oder, wenn kein Vaginalpfropf aufgetreten war, ebenso lange nach Beginn der Paarungswoche wurde die Zahl der graviden Weibchen, der Corpora lutea sowie der lebenden und toten Embryonen bestimmt.

Bestrahlt wurde mit Dosen von 50, 100, 200, 300, 600 und 1 100 R. Folgende Werte wurden in ihrer Abhängigkeit von der Dosis ermittelt:

Zahl der befruchteten Weibchen,

Verlust an Früchten vor Implantationen in % der Corpora lutea, Verlust nach Implantation in % der Corpora lutea und in % der Implantate.

Bisherige Ergebnisse:

Der Unterschied zwischen der mutagenen Wirkung einer Totalbestrahlung und einer isolierten Bestrahlung der Hodenregion unter Zugrundelegung der gleichen lokalen Gewebsdosis im Hodenbereich ist nicht so ausgeprägt, wie er in einer früheren vorläufigen Beobachtung unseres Instituts beschrieben wurde (HUG 1964) und bedarf daher noch der weiteren Prüfung. Auf jeden Fall lohnt es sich, die Frage einer indirekten Strahlenwirkung auf die Keimzellen weiter zu verfolgen, da diese zwar in Drosophila-Experimenten ausgeschlossen wurde, aber bei Säugetieren noch nicht geprüft worden ist.

In der ersten und zweiten Woche steigt die Mutationsrate linear mit der Dosis an, wobei sich gute Übereinstimmung mit den Werten LEONARDS an BALB/C-Inzuchtmäusen ergibt. In der dritten und vierten Woche ist die Mutationsrate pro R etwa doppelt so hoch wie in der ersten und zweiten Woche, steigt bis 600 R annähernd linear an, um dann bei einer Dosis von 1 100 R nur noch $1/3$ des Wertes bei 600 R zu betragen, wobei sich Analogien zu den bekannten Zeitfaktorstudien der beiden RUSSELLs ergeben. In der 5. Paarungswoche sind alle mit 600 und 1 100 R bestrahlten Männchen steril. Die Zahl der unbefruchteten Weibchen nimmt linear mit der Dosis und von Paarungswoche zu Paarungswoche zu, um in der 5. Woche p.r. nach 600 R 100 % zu erreichen.

Die Tiere einiger bestrahlter Versuchsgruppen wurden auch nach Ablauf der sterilen Phase getestet. Die Absolutzahlen für Dominantletale liegen nur wenig über den Kontrollwerten. Nach Bestrahlung mit 600 R ist die Zahl der Dominantletalien etwa so groß wie in den prästerilen Wochen nach Bestrahlung mit 100 R. Einzelversuche, bei denen der Rumpf unter Abdeckung des Hodens mit 1 100 R bestrahlt worden war, erbrachten keine höhere Mutationsrate als aufgrund der Streustrahlung zu erwarten war.

Wirkungsunterschiede bei unterschiedlicher zeitlicher Dosisverteilung wurden in mehreren Versuchsreihen geprüft, in denen die Dosis von 600 R in Fraktionen von 2 x 300 und 4 x 150 R mit 24-stündigen Intervallen fraktioniert wurde oder mit einer Dosisleistung von 3 - 4 R pro Minute appliziert wurde. Die Auswertung dieser Versuche ist noch nicht abgeschlossen.

1.2 Strahlengenetische Studien an Fischen

Inzuchtstämme des Guppys (*Lebistes reticulatus*), die sich durch wohldefinierte autosomalrezessive und gonosomale Faktoren unterscheiden, wurden nach schrittweisem Aufbau einer Aquarienanlage gezüchtet und auf verwertbare Individuenzahlen gebracht. Ein besonderer, dreifachhomozygoter Stamm "Albino-weiß" (aa bb rr) wurde durch Rekombination neu hergestellt. Die Aquarienanlage befindet sich noch im weiteren Ausbau und besteht z.Zt. aus ca. 300 Becken verschiedenen Fassungsvermögens.

1.21 Vorversuche zur Bestimmung der akuten Letalität nach Ganzkörperbestrahlung

Fische verschiedener Inzuchtstämme wurden mit Dosen von 1000 bis 5000 R total bestrahlt und die Überlebenszeit und akute Mortalität innerhalb der ersten 30 Tage in Abhängigkeit von der Dosis bestimmt. Aus zwei Stämmen verschiedener Provenienz entstandene Hybriden zeigten, gemessen an der gesamten Überlebenszeit und der LD₅₀, eine wesentlich größere Strahlenresistenz als die Inzuchtstämme. Die LD₅₀ betrug für Inzuchtstämme im Mittel ca. 2800 R, für Hybriden ca. 3700 R. Die Überlebenszeit nach 3000 und 5000 R war bei den Hybriden zwei- bis fünfmal länger als in den Inzuchtstämmen. Innerhalb der Inzuchtstämme bestehen ebenfalls Unterschiede der Strahlenempfindlichkeit; am empfindlichsten sind die Stämme "blond" und "blau", Stämme mit verminderter Melanophorenzahl bzw. ohne Xanthophoren. Auch die relativ strahlenresisten-

ten Wildstämme zeigen untereinander starke Differenzen. Bestrahlte Männchen leben durchschnittlich länger als bestrahlte Weibchen desselben Stammes und Wurfes.

1.22 Bestimmung rezessiver Mutationen nach Bestrahlung

Beide Geschlechter eines Lebistes-Wildstammes (wild, $X_{Ch}X_{Ch}^0$, $X_{Ch}Y_{Ir}^0$) wurden mit 1000 R total bestrahlt. Die Nachkommen der bestrahlten Tiere wurden, unterteilt nach dem Intervall zwischen Geburt und dem Bestrahlungstermin der Eltern, zur F_2 -Generation weitergezüchtet. In dieser Generation wurden folgende Größen registriert:

Die Wurfgröße als Maß für die Fertilität, die durch Translokationen herabgesetzt werden kann;
das Geschlechtsverhältnis als Ausdruck für geschlechtsgebundene rezessive Letalfaktoren;
die postnatale Mortalität als Anzeichen für autosomale rezessive Letalfaktoren und
die Häufigkeit von Anomalien (hauptsächlich Deformierungen der Wirbelsäule und Verkürzung des Schwanzstieles) als Kriterium für rezessive sichtbare Mutationen.

Als bestes Anzeichen für die genetische Schädigung kann die postnatale Mortalität gelten. Die Tiere sterben überwiegend im Alter zwischen 40 und 50 Tagen, d.h. zu einem Zeitpunkt, an dem die Geschlechtsreife erlangt wird. Von großem Interesse ist die Häufigkeit der Anomalien, die in der F_2 -Generation auftreten. In einigen Versuchen wurden Vergleiche mit einer Outcrossing-Generation, mit einem anderen Stamm und nach einer Bestrahlung nur der männlichen Keimzellen mit 500 und 1000 R durchgeführt.

Bisherige Ergebnisse:

Im Hauptversuch wurde die Strahlenempfindlichkeit verschiedener Gametogenese-Stadien nach Bestrahlung beider Geschlechter in der F_2 -Generation verglichen. Bezüglich der

postnatalen Mortalität erwiesen sich die postmeiotischen Stadien (Spermien, Spermatiden und Eier) als besonders empfindlich. Bei den prämeiotischen Stadien ließ sich eine deutliche Dreiteilung (vgl. FOLLENIUS 1952 und KESSLER & LUTHER 1957) erkennen.

Die früheren Stadien (wahrscheinlich den Urspermatogonien entsprechend) zeigen eine relativ hohe Mortalität, die mittleren Stadien (primäre Spermatogonien mit entsprechenden Oogenese-Stadien) eine sehr geringe und die späten meiotischen Stadien (sekundäre Spermatogonien vor Eintritt in die Meiose) eine sehr hohe Mortalitätsrate. Die Zahl der Anomalien war ebenfalls bei den späten meiotischen Stadien sehr hoch. Weitere Gipfel liegen im meiotischen und postmeiotischen Stadium. Hinsichtlich aller vier oben genannten Parameter zeigen die späten prämeiotischen Stadien (sekundäre Spermatogonien mit entsprechenden oogenetischen Stadien; die Dauer der Oogenese ist aus der Literatur nicht ersichtlich, entspricht nach Befunden von STOLK 1950 aber wahrscheinlich der Spermatogenese) und die postmeiotischen Stadien die größte genetische Schädigung. Gemessen an der Wurfgröße, der postnatalen Mortalität, des Geschlechtsverhältnisses und der Häufigkeit von Anomalien ergab sich die folgende Reihenfolge der Gametogenese-Stadien nach abnehmender Strahlenempfindlichkeit: Unreife Keimzellen >Gametozyten> sekundäre Gametogonien >primordiale Gametogonien >reife Keimzellen> primäre Gametogonien.

Die bisher beobachteten sichtbaren Mutationen (Verkürzungen des Schwanzstieles, Kyphosen und Lordosen, zwei autosomale Farbmутanten, kongenitale Schwimmblasendefekte und Zwergwuchs mit unklarer Geschlechtsrealisierung) werden z.Zt. kreuzungsanalytisch weiter verfolgt, sofern ihre Träger fertil sind.

1.23 Mutationen spezifischer Loci

Es wäre natürlich sehr vorteilhaft, wenn die strahleninduzierte Mutationsrate einzelner Gene, deren Testung außerordentlich hohe Tierzahlen erfordert, an Fischen bestimmt werden könnte, da ihre Generationsfolge schneller, die Wurfzahl höher und die Haltung billiger ist als bei Mäusen. Deshalb wurden Experimente begonnen, nach deren Ergebnissen entschieden werden soll, ob ein Großversuch vertretbar ist. Neonate Fische eines Wildstammes ($AA\ BB\ RR, X_+Y_{Cp, Ds}$) wurden mit 1000 R ganzkörperbestrahlt. Die Keimzellen sind zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht sexuell differenziert, es werden also nur primordiale Keimzellen bestrahlt. Die bestrahlten Fische werden mit dreifach homozygoten Tieren des Inzuchtstammes "Albino-weiß" ($aa\ bb\ rr$) gepaart. Tritt in der F_1 ein Mutantenphänotyp (aa = albino, rr = blau, bb = blond) auf, so muß eine Mutation vom Normalallel zum mutierten Gen oder eine Deletion des Wildlocus induziert worden sein. Deletionen wirken homozygot meist letal und können daher durch Ausfall der betreffenden Phänotypen in den nächsten Generationen erkannt werden. Das doppelt markierte Y-Chromosom des Wildstammes neigt zum crossing-over mit dem X-Chromosom; die Strahlenabhängigkeit dieses Vorganges wird gleichzeitig ermittelt.

1.24 Mutationen polygener Faktoren

Auch für die Erfassung von polygenen Faktoren scheinen sich Fische gut zu eignen. Die F_1 -Generation bestrahlter Eltern wird zur F_2 - und RF_2 -Rückkreuzungsgeneration weitergeführt. An den Individuen dieser Generation werden quantitative, metrisch leicht zugängliche Merkmale verfolgt, um Aussagen über strahleninduzierte polygene Mutationen zu gewinnen.

Zusammenfassung:

(101 ♀ x C3H ♂)-männliche Mäuse wurden mit Dosen zwischen 50 und 1100 R bestrahlt und die Zahl der Dominantletalen nach Paarung mit unbestrahlten (101 ♀ x C3H ♂)-Weibchen durch Untersuchung des Uterusinhaltes bestimmt. Die Zahl der Postimplantationsverluste steigt bis 600 R annähernd linear mit der Dosis an, um bei 1100 R abzufallen. Spermatischen sind doppelt so empfindlich bei Spermatozoen-Totalbestrahlung der Tiere und isolierte Hodenbestrahlung wirken nicht signifikant verschieden. Die Abhängigkeit von der zeitlichen Dosisverteilung wird geprüft. Für genetische Studien an Fischen wurden mehrere Inzuchtstämme von *Lebistes reticulatus* gezüchtet, ihre akute Strahlenmortalität bestimmt, die mutagene Empfindlichkeit der verschiedenen Gametogenese-Stadien ermittelt und Versuchsreihen zur Erfassung strahleninduzierter mutationsspezifischer Loci und polygener Faktoren begonnen.

2. Funktionsstörungen des Nervensystems nach Bestrahlung

Nachdem das Zentralnervensystem lange Zeit als relativ strahlenresistent angesehen wurde, haben neuere Untersuchungen, die sich empfindlicherer Meßmethoden bedienen, zweifelsfrei nachgewiesen, daß auch das erwachsene Nervensystem auf relativ kleine Strahlendosen reagiert. In noch höherem Maße trifft das für das embryonale Nervengewebe zu. In den letzten Jahren ist der Nachweis von funktionellen Störungen - zum Teil passagerer Natur - nach Bestrahlungen mit Dosen von 10 R und darunter gelungen.

Insbesondere sowjetische Wissenschaftler haben sich, basierend auf ihrer in Pawlow begründeten Tradition, frühzeitig mit der Strahlenwirkung auf das Nervensystem befaßt und glaubten bei außerordentlich kleinen Strahlendosen funktionelle Störungen verschiedenster Art festgestellt zu haben. Auch in der westlichen Welt hat die Strahlenwirkung auf das Nervensystem in den letzten 10 Jahren steigendes Interesse gefunden. Die bisherigen Resultate, wie sie in 3 besonderen Symposien vorgetragen (IAEA, HALEY, HALEY and SNIDER) und vor kurzem in einem umfassenden Referat von GANGLOFF-HUG (1965) dargestellt wurden, erstrecken sich von Untersuchungen über Veränderungen der elektrischen Eigenschaften einzelner Nervenzellen bis zu elektroencephalographischen Untersuchungen und schließen Verhaltensstudien ein. Untersuchungen unseres Instituts gingen von der Beobachtung aus, daß eine Reihe niederer Tiere unmittelbar unter Bestrahlung reflexartige Sofortreaktionen und Verhaltensstörungen aufwiesen, deren Abhängigkeit von Dosis und Dosisleistung so zu deuten ist, daß ionisierende Strahlen als Stimuli im Sinne der klassischen Reizphysiologie gelten können. Im Laufe der letzten Jahre haben wir ausgehend von verschiedenen Objekten und Methoden die Wirkungsweise ionisierender Strahlen auf erregbare Systeme weiterverfolgt und dabei intrazelluläre Potential- und Widerstandsmessungen, unmittelbare Reaktionen einzelner Zellen,

physiologische Störungen an zahlreichen glattmuskulären Organen und auch charakteristische Änderungen im Elektroenzephalogramm unter und kurz nach Bestrahlung beobachten können. In allen bisherigen Untersuchungen bleiben aber eine Reihe ganz entscheidender Fragen völlig ungeklärt: Bei den Strahlenwirkungen auf das Nervensystem von Säugtieren ist in keinem einzigen Fall der Angriffsort der Strahlung eindeutig geklärt. Zwar wurden in verschiedensten Arbeiten cortikale Reaktionen, Veränderung der Ansprechbarkeit auf Elektroschocks, Störungen der elektrischen Aktivität präpyriformer Strukturen und andere Sofortreaktionen beobachtet, sehr oft jedoch erlauben die experimentellen Bedingungen keine eindeutigen Schlüsse auf den Angriffsort der ionisierenden Strahlen oder gar auf die zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen.

Das begonnene Forschungsvorhaben hat deshalb das Ziel, Erregbarkeiten verschiedener zentralnervöser Strukturen unter klar definierten, eindeutigen physiologischen Bedingungen zu testen. Dazu ist der Aufbau eines universellen, elektrophysiologischen und neurophysiologischen Meßplatzes notwendig, um in akuten und chronischen Versuchen die Funktion des Zentralnervensystems nach Bestrahlung zu untersuchen. Außer den akuten, voraussichtlich zum größten Teil temporären Reaktionen auf Bestrahlung sollen insbesondere permanente Schäden nach Bestrahlung des erwachsenen Tieres und nach Bestrahlung in verschiedenen Stadien des prä- und postnatalen Lebens, also nach strahlenbedingter Störung der Entwicklung des Gehirns, erfaßt werden. Parallel dazu sind Verhaltensstudien an bestrahlten Tieren geplant, die zu gegebener Zeit zu einer kombinierten Untersuchung mittels elektrophysiologischer und Verhaltensmethoden führen sollen.

Bisherige Arbeiten

2.1 Aufbau einer universellen, neurophysiologischen Meßeinheit

Mitte des Jahres konnte mit dem Aufbau der Versuchseinheit begonnen werden. Sie ist jetzt im großen und ganzen beendet. Sie setzt sich folgendermaßen zusammen:

- a) Impulsgeneratoren zum elektrischen Reiz von Strukturen des Zentralnervensystems mittels stereotaktisch eingebrachter Elektroden.
- b) Eine Registrieranlage, bestehend aus Wechsel- und Gleichstromverstärker, Kathodenfolger, Kathodenstrahl-oszillographen, Registrierkamera und achtkanäligem Direktschreiber, geeignet zur Ableitung aus stereotaktisch implantierten Elektroden und zur intrazellulären und parazellulären Ableitung von einzelnen Zellen.
- c) Eine Datenverarbeitungsanlage mit vierspurigem Tonbandgerät und Computer.
- d) Zusätzliche Geräte, wie Operationsmikroskop zur Herstellung von Metall- und Glasmikroelektroden und Messung ihrer elektrischen Eigenschaften, stereotaktischem Gerät für Implantation von intrazerebralen Makro- und Mikroelektroden.

Mittels dieser Einrichtungen wurden die ersten Versuche an Katzen erfolgreich durchgeführt.

Durch Ganz- und Teilkörperbestrahlung wird eine Abgrenzung direkter Wirkungen auf das Zentralnervensystem von physiologischen indirekten Wirkungen (abscopal effects) versucht. Dazu ist es notwendig, außer den elektrischen Ableitungen aus dem Gehirn laufend andere physiologische Größen wie EKG, Herzfrequenz und Blutdruck, Atemfrequenz und -volumen mit zu registrieren. Außer elektrophysiologischen Eigenschaften des ruhenden Gehirns mit und ohne Bestrahlung werden mittels der evoked-potential-Technik Änderungen der Ansprechbarkeit auf verschiedene Stimuli erfaßt. Dieser Test wird in besonders gut unter-

suchten cortikalen Arealen bei der Katze durchgeführt. Die elektrische Aktivität größerer cortikaler Zellbereiche wird dabei mit Makroelektroden im Cortex nach Reizung verschiedener Afferenzen registriert. Durch gleichzeitige Aufnahme der elektrischen Aktivität von Einzelzellen des gesamten Zentralnervensystems sollen die besonders strahlenempfindlichen Funktionsglieder des Zentralnervensystems ermittelt werden.

2.2 Verhaltensforschung

Zur Einarbeitung in die Verhaltensforschung und zur Auswahl geeigneter Tests für die Erfassung eines Strahlenschadens befindet sich ein Mitarbeiter seit Anfang 1965 in dem Dept. of Physiology, School of Medicine (Prof. DELGADO) der Yale-University, New Haven/Conn. USA. Er wird für Anfang 1966 zurückerwartet, um dann mit dem Aufbau der Laboratorien für die Verhaltensstudien zu beginnen.

2.3 Vorbereitende embryologische Studien

Als Grundlage für das Studium funktioneller Störungen des Nervensystems nach Bestrahlung während der Embryonalentwicklung dienen Untersuchungen der gegenüber ionisierenden Strahlen und chemischen Teratogenen empfindlichen Phasen der Embryonalentwicklung. In Fortsetzung früherer Arbeiten des Instituts wurde die vorgeburtliche Entwicklung der Maus und der Ratte untersucht und eine Zeitskala für die Frühentwicklung, Furchung, Blastogenese, die darauffolgende embryonale Entwicklungsphase und die frühe fetale Entwicklungsphase aufgestellt. Die Ausbildung des Nervensystems wurde im einzelnen verfolgt. Die kritischen Phasen für die Erzeugung von Mißbildungen des Gehirns nach Einwirkung chemischer Teratogene (Cyclophosphamid, Methylnitrosoharnstoff) wurden ermittelt und mit den in der Literatur niedergelegten Daten über die teratogene Wirkung ionisierender Strahlen, insbesondere von HICKS,

RUGH, RUSSELLs, sowie mit laufenden strahlenembryologischen Studien anderer Institute -(Dr. KRIEGEL, Heiligenberg, Prof. OSTERTAG, Tübingen) in wiederholten Besprechungen verglichen.

Durch Fortsetzung der eigenen Versuche und in weiterem Kontakt mit den entsprechenden embryologischen Zentren ist es möglich, für die geplanten Versuche die kritischen Dosen und Phasen zu wählen, bei denen keine oder nur in geringem Prozentsatz makroskopische Mißbildungen auftreten, aber aufgrund histologischer und cytologischer Untersuchungen des embryonalen und fetalen Gehirns funktionelle Schäden im späteren Leben zu erwarten sind.

Zusammenfassung:

Zum Studium der akuten und chronischen Strahlenwirkungen auf das sich entwickelnde und reife Säugetiergehirn werden elektroencephalographische Methoden entwickelt und erprobt, die Vorbereitungen für eine Verhaltensforschung an bestrahlten Tieren getroffen und in vergleichenden embryologischen Studien die teratogenen Wirkungen chemischer Substanzen und ionisierender Strahlen auf das embryonale und fetale Gehirn untersucht.

3. Studien zur Pathogenese akuter und chronischer Strahlenschäden im Säugetierorganismus

Durch eine Kombination statistischer und morphologischer Methoden wird die Pathogenese akuter und chronischer Strahlenschäden in den verschiedenen Organen des Säugetierorganismus untersucht. Dabei steht im Vordergrund des Interesses die Abhängigkeit pathogener Strahleneinwirkungen von der Strahlenart und der zeitlichen und räumlichen Dosisverteilung sowohl nach relativ homogener Bestrahlung von außen als auch nach Inkorporation von Radionukliden. Aufschlüsse über die Wirkungsweise ionisierender Strahlen erhoffen wir uns durch vergleichende Studien mit Radionukliden, die chemisch identisch sind, und die sich im Stoffwechsel gleichartig oder ähnlich verhalten, sich aber durch verschiedene Halbwertszeiten und Art und Energie der emittierten Strahlen unterscheiden. Außerdem soll die Pathogenese von Strahlenschäden nach Inkorporation von Radionukliden studiert werden, die sich durch eine besondere Affinität zu bestimmten Zell- und Gewebsstrukturen auszeichnen. Bei den Untersuchungen über das Auftreten und die Entstehung somatischer Spätschäden, insbesondere maligner Neubildungen, sind entsprechend große Versuchsserien zur statistischen Auswertung geplant. Die zu erwartenden degenerativen, reparativen und blastomatösen Veränderungen sollen außer mit herkömmlichen morphologischen Methoden auch unter Einsatz moderner vor allem histochemischer Techniken studiert werden, um damit latente Strahleneinwirkungen, die gröberen morphologischen Veränderungen vorausgehen und u.U. schon nach Einwirkung kleiner Strahledosen auftreten, zu erfassen und um einen tieferen Einblick in die Pathogenese der Strahlenschäden im Sinne einer funktionellen Morphologie zu erhalten.

3.1 Strahlenphysikalische, metabolische und toxikologische Studien mit Radium 224 (Thorium X)

Zu vergleichenden Studien über die Rolle der räumlichen und zeitlichen Dosisverteilung bei der Ausbildung von Strahlenschäden wurde zunächst das Nuklid Radium 224 (Thorium X) gewählt, und zwar aus folgenden Gründen:

Bei den sog. "Bone seekern" ergab sich das Problem, ob für die Entwicklung von Osteosarkomen mehr die Totaldosis oder die relativ hohe initiale Dosisleistung im Skelettsystem entscheidend sei. Ein Vergleich chemisch identischer ~~strahlender~~ Nuklide des Radium mit erheblichen Unterschieden der Halbwertszeit müßte hier Aufschlüsse geben können, auch wenn die räumliche Dosisverteilung infolge der unterschiedlichen Strahlenenergien der Nuklide und ihrer jeweiligen Tochterprodukte nicht völlig identisch ist und auch sonst gewisse Schwierigkeiten zu erwarten sind.

Seit Jahrzehnten liegen ausführliche klinische und experimentelle Daten über die Resorption, Verteilung, Ausscheidung und die Spätschäden nach Inkorporation des langlebigen Nuklides Radium 226 vor, so daß die Untersuchungen mit Radium 224 darauf aufgebaut werden könnten. Ferner können bisherige Ergebnisse eines laufenden Versuchsprogramms der Universität Utah an Hunden verwertet werden.

Die Strahlenschäden durch Radium 224 haben insofern eine praktische Bedeutung gewonnen, als Untersuchungen von Kindern, die vor etwa 15 Jahren wegen Knochentuberkulose mit diesem Nuklid behandelt worden waren, in einem ungewöhnlich hohen Prozentsatz Wachstumsstörungen und Osteosarkome aufgedeckt haben.

3.11 Strahlenphysikalische, metabolische und toxikologische Studien

Da bei einmaliger Zufuhr des Radionuklides graduierte Dosen bis zur maximal möglichen Höhe angewandt werden sollten, wurde zunächst die akute Letalität von Ratten

und Mäusen nach intraperitonealer Injektion von Radium 224 bestimmt. Die Ratte ist dabei bezogen auf Mikrocurie/kg Körpergewicht wesentlich strahlenempfindlicher als die Maus. Die LD 50/14 Tage betrug bei Mäusen 155 Mikrocurie/kg, bei Ratten 25 Mikrocurie/kg. Eine 100 %ige akute Letalität wird bei Mäusen mit Dosen ab 300 Mikrocurie/kg, bei Ratten mit 40 Mikrocurie/kg erreicht. Dem Tod geht ein kontinuierlicher Gewichtsverlust in den ersten 5 Tagen nach der Injektion voraus. Überlebende Tiere zeigen nach einiger Zeit wieder eine Gewichtszunahme, bleiben aber auch weiterhin um 20 bis 25 % unter dem Gewicht der Kontrollen. Bei der Untersuchung von ca. 100 Tieren fanden sich keine signifikanten Unterschiede der akuten Letalität zwischen beiden Geschlechtern und bei Variation des Alters zwischen 4 - 12 Wochen.

3.12 Ausscheidung und Retention von Radium 224 und Tochterprodukten bei Ratten

Die Retention von Radium 224 wurde durch regelmäßig wiederholte Ganzkörpermessungen bei Ratte und Maus bestimmt. Dabei wurde die Pb 212- γ -Linie mit Szintillationskristall und Vielkanalanalysator gemessen. Die Retention zeigte bei beiden Tierspezies im Prinzip den gleichen Verlauf. In den ersten zwei Tagen fällt die Aktivität schnell auf 40 % des Anfangswertes ab und nimmt dann nur noch entsprechend der physikalischen Halbwertszeit von 3,64 Tagen ab.

Die Radium-Ausscheidung in den ersten 2 - 3 Tagen ist in den Faeces zehnmal größer als im Urin. Die Ausscheidung des Tochterproduktes Pb-212 dagegen erfolgt vorzugsweise über den Urin. Nach dieser Zeit ist die Ausscheidung sehr klein.

3.13 Organverteilung

Die Verteilung von Ra-224 und Pb-212 über die verschiedenen Organe variiert außerordentlich. Nach 24 und 48

Stunden findet sich ein Pb-212-Überschuß in Herz, Leber, Niere und Thymus und eine Ra-224-Anreicherung in Milz und Knochen. Absolut gesehen befand sich schon nach 24 Stunden mehr als 90 % des retinierten Radiums 224 im Knochen. Tochterprodukte werden jedoch noch in andere Organe umgelagert. Ausführliche Verteilungsstudien sind in Vorbereitung.

3.14 Skelettdosisberechnungen

Die Dosis und Dosisleistung im Skelett nach Zufuhr von Ra-224 wurde in der Abhängigkeit von der Zeit errechnet und mit dem Dosisverlauf nach Zufuhr von Ra-226 verglichen. Dabei wurden die theoretischen Überlegungen des UTAH-Programms (T.F. DOUGHERTY) im wesentlichen übernommen.

Ein Vergleich der eigenen Messungen mit den Literaturdaten ergibt folgende Anfangsdosisleistungen im Skelettsystem der Maus.

Für Ra-226: 4 rad/Tag pro $\mu\text{Ci/kg}$

Für Ra-224: 8 rad/Tag pro $\mu\text{Ci/kg}$

Für die Dosisleistung im Skelett zur Zeit $t(DL_t)$ gilt dann im Falle der Maus

$$DL_t = F(t) \cdot A_{\text{Ra-226}} \cdot 4 \text{ (rad/d)}$$

dabei ist $F(t) = 0,7 \cdot t^{-0,28}$ (Ausscheidungsfunktion
 A = injizierte Aktivität ($\mu\text{Ci/kg}$))

Für Ra-224 ergibt sich:

$$DL_t = F(t) \cdot A_{\text{Ra-224}} \cdot 8 \cdot e^{-0,19 t} \text{ (rad/d)}$$

Die innerhalb einer Zeit T erreichte Gesamtskelettdosis D errechnet sich dann für Ra-224:

$$D = 8 A \int_0^T F(t) \cdot e^{-0,19 t} dt \text{ (rad)}$$

Während bei Ra-224 der Höchstwert der Gesamtdosis bereits 20 Tage nach Applikation des Nuklides erreicht ist und etwa 28 rad/Mikrocurie/kg beträgt, gibt Ra-226 in dieser Zeit nur etwa 12 % der Dosis ab, die nach 2 Jahren erreicht ist. Aufgrund dieser Abschätzungen, die durch gewebsdosimetrische Methoden verifiziert werden sollen, wurde ein größerer Versuch zur statistischen Erfassung von Osteosarkomen in Abhängigkeit von der zugeführten Ra-224-Aktivität und Skelettdosis geplant und zu Beginn des Jahres 1966 begonnen. Die parallel laufenden histologischen und histochemischen Untersuchungen sind in Abschnitt 3.22 dieses Berichtes beschrieben.

3.2 Pathologische und histochemische Studien

3.21 Methodische Untersuchungen

Da zum Studium der Pathogenese akuter und chronischer Strahlenschäden eine große Zahl verschiedener histochemischer Untersuchungsverfahren eingesetzt werden soll und die methodische Entwicklung der Histochemie noch erheblich in Fluß ist, muß auf die Bearbeitung der methodischen Grundlagen der Histochemie besonderes Gewicht gelegt werden.

Im Hinblick auf die geplanten Experimente mit knochenaffinen Isotopen wurden methodische Untersuchungen zur Histochemie des Knochengewebes zunächst in den Vordergrund gestellt.

Dabei interessieren vor allem das Verhalten:

- a) der Grundsubstanz (Alcianblaufärbung, PAS-Reaktion, Metachromasie)
- b) verschiedener Enzyme, besonders der alkalischen und sauren Phosphatase als Indikatoren für Knochenapposition und -resorption.
- c) der Tetracyclinbindung innerhalb der Verkalkungszone.

Dabei bestehen vor allem im Hinblick auf Fixierung, Entkalkung und Herstellung unentkalkter Knochenschnitte eine Reihe methodischer Schwierigkeiten.

Zur Enzymdarstellung im Knochengewebe wurden bisher die besten Erfahrungen mit kurzer Fixierung in kaltem Formalin, Entkalkung mit EDTA und Herstellung der Schnitte im Kryostaten gemacht.

Außerdem wurden Versuche zur Präparation nativer und unentkalkter Schnitte im Kryostaten für die Tetracyclinversuche und evtl. auch spätere autoradiographische Untersuchungen durchgeführt.

3.22 Morphologische und histochemische Studien zur akuten Toxizität nach Inkorporation von Radium-224 (Thorium X)

Im Rahmen der akuten Toxizitätsversuche an Ratten wurde eine Reihe (bisher 38) von Tieren in verschiedenen Zeitintervallen (1 - 12 Tage) nach intraperitonealer Applikation verschiedener Dosen (10, 20, 40, 50, 75, 100, 300 und 1500 Mikrocurie pro kg) Ra-224 histologisch untersucht. Zusätzlich wurden an diesem Material erste orientierende histochemische und enzymhistochemische Untersuchungen vorgenommen.

Die um den 10. Tag nach Inkorporation von mehr als 40 Mikrocurie pro kg Ra-224 spontan gestorbenen Tiere zeigen makroskopisch deutliche Anzeichen einer Schädigung des hämatopoetischen Systems mit ausgedehnten Blutungen im subkutanen Bindegewebe, unter der Thymuskapsel, im Knochenmark, in Lymphknoten und Nebennieren. Ein hoher Prozentsatz der Ratten starb an einer massiven Nebennierenblutung.

Histologische und histochemische Befunde:

Knochen und Knochenmark

Am Epiphysenknorpel von Femur und Tibia sind bereits kurze Zeit nach der Inkorporation regressive Prozesse in der Zone des Säulenknorpels, später auch in der Zone des proliferierenden Knorpels zu erkennen.

Gleichzeitig kommt es zu charakteristischen Veränderungen in der Topik der alkalischen Phosphatase im Bereich der Knorpelplatte.

Auch in der primären Spongiosa treten regressive Veränderungen vor allem Kernregressionen und schließlich Zelluntergänge auf.

Schon in den ersten Tagen nach der Inkorporation und auch bei niedriger Dosierung kommt es zu einem vollständigen Schwund des blutbildenden Gewebes im metaphysären Knochenmark.

Im Knochenmark der Diaphyse fallen maximale Erweiterung der prall mit Erythrocyten gefüllten Sinus und Blutungen auf; außerdem sind hier regressive Veränderungen an den hämatopoetischen Zellen zu erkennen.

Milz

Frühzeitig und in allen untersuchten Dosisbereichen ist ein mehr oder weniger deutlicher Schwund der Lymphocyten in der weißen Pulpa und zugleich eine starke Vermehrung der Reticulumzellen in der roten Pulpa festzustellen.

Bei einem großen Teil der Tiere finden sich kleinere und größere Nekrosen in der Milzpulpa, die oft eine deutlich perifollikuläre Anordnung zeigen.

Entsprechend der Vermehrung der Reticulumzellen ist auch histochemisch eine Zunahme der sauren Phosphatase zu beobachten.

Leber

In der Leber treten häufig feinfleckige umschriebene Nekrosen von Leberzellen, bevorzugt im Zentrum der Leberläppchen auf. In der Umgebung dieser Nekrosen sind keine reaktiven Prozesse zu erkennen.

Im Leberparenchym finden sich inselförmige Bezirke mit deutlich von der Norm abweichender Verteilung und Aktivi-

tät der lysosomalen sauren Phosphatase in den Leberzellen. Dies steht sicher mit den erwähnten regressiven Veränderungen im Zusammenhang.

Besonders auffallend ist eine erhebliche Proliferation und Schwellung der Kupffer'schen Sternzellen, deren Cytoplasma in großer Menge PAS-positive Tropfen und saure Phosphatase enthält.

Die bisher vorliegenden histologischen Befunde bei der Ratte lassen vermuten, daß Ra-224 neben seiner Affinität zum Knochengewebe auch eine Affinität zum reticuloendothelialen System besitzt und die hier und im Knochenmark gesetzten Schäden wohl im wesentlichen für die akute Toxizität verantwortlich zu machen sind.

Durch autoradiographische Untersuchungen an verschiedenen Organen soll die Verteilung des Ra-224 im mikroskopischen Bereich und damit die Zuordnung zu den morphologischen und histochemischen Veränderungen geprüft werden.

3.23 Untersuchungen zur Pathogenese und Histochemie von Strahlenschäden nach Röntgenbestrahlung

Ziel dieser Untersuchungen ist, mit histochemischen Methoden einen Einblick in das Verhalten bestimmter strukturgebundener Enzyme verschiedener strahlensensibler Gewebe während der Schädigungs- und der Reparationsphase zu gewinnen.

3.231 Lokale Röntgenbestrahlung des Kniegelenks wachsender Ratten

Es wurden Untersuchungen über die Wirkung einer einmaligen lokalen Röntgenbestrahlung des Kniegelenks wachsender Ratten mit 3000 und 2000 R begonnen, um die morphologischen und histochemischen Veränderungen im Bereich der Wachstumszonen von Femur und Tibia im Vergleich zum normalen ungestörten Knochenwachstum zu studieren.

Die bei diesen Untersuchungen erhobenen Befunde sollen zugleich als Vergleichsmaterial für entsprechende Studien nach Inkorporation knochenaffiner Isotope dienen.

Bisher wurde eine Versuchsreihe mit 3000 R in zeitlichen Intervallen zwischen 1 und 126 Tagen bearbeitet.

Am 9. Tag nach der Bestrahlung ist ein vollkommener Wachstumsstillstand an Tibia und Femur festzustellen, der über den untersuchten Zeitabschnitt bestehen bleibt.

Am Epiphysenknorpel stellen sich frühzeitig schwere regressive Veränderungen ein, die sich vor allem am histochemischen Verhalten der Knorpelgrundsubstanz manifestieren.

Am 9. Tag nach der Bestrahlung ist im Epiphysenknorpel keine alkalische Phosphatase mehr nachweisbar. Dieser Enzymverlust bleibt während der ganzen Beobachtungszeit bestehen (Abbildung 1 und 2).

Nach einer Bestrahlung mit 2000 R treten im Epiphysenknorpel nach 3 Wochen inselförmige Knorpelzellregenerate auf, die sich im histochemischen Präparat durch eine deutliche Aktivität an alkalischer Phosphatase auszeichnen.

3.232 Verhalten der alkalischen Phosphatase in der Dünndarmschleimhaut der Maus nach Röntgenbestrahlung

Es wurde eine größere Versuchsreihe (zunächst 66 Tiere einschl. Kontrollen) an Mäusen (101 x C3H-Hybriden) begonnen, um das Verhalten der alkalischen Phosphatase in der Dünndarmschleimhaut nach Ganzkörperbestrahlung, bzw. Bestrahlung des Abdomen zu studieren.

Durch diese Untersuchungen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Hat eine Bestrahlung in verschiedenen Dosisbereichen einen direkten Effekt auf Aktivität und Lokalisation der alkalischen Phosphatase der Dünndarmzotten.

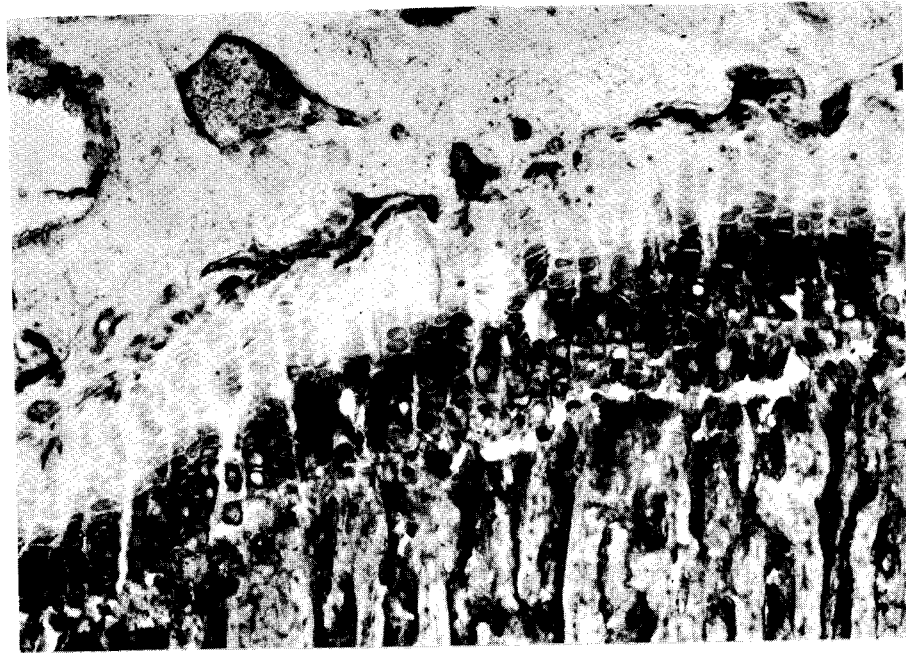


Abb. 1. Tibia einer normalen Ratte.
 Darstellung der alkalischen Phosphatase mit einer
 Azofarbstoffmethode.
 Starke Aktivität der alkalischen Phosphatase (schwarz)
 im Säulenknorpel.

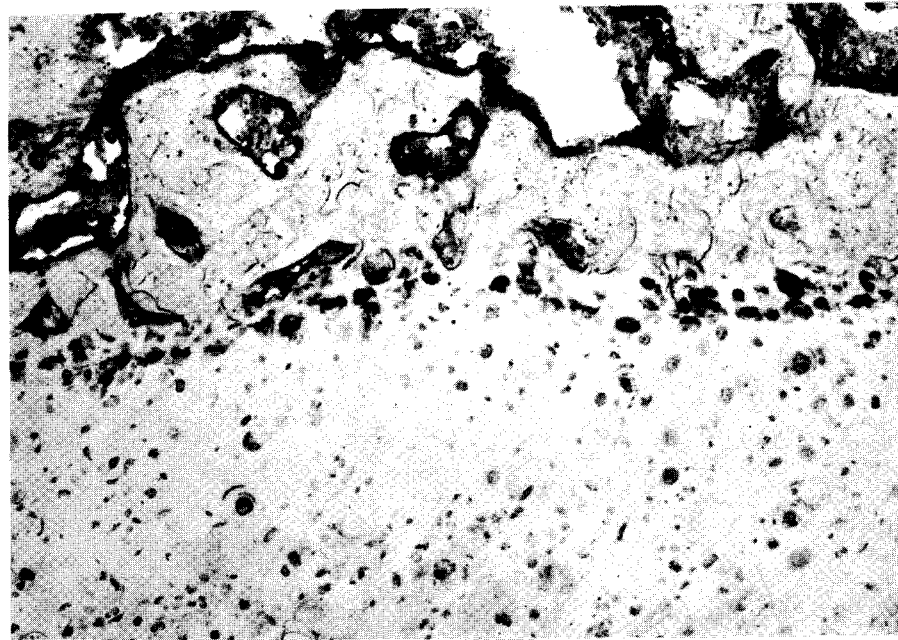


Abb. 2. Tibia einer Ratte, 7 Wochen nach lokaler Bestrahlung
 des Kniegelenks mit 3000 R. Darstellung der alkalischen
 Phosphatase mit einer Azofarbstoffmethode. Schwere
 degenerative Veränderungen am Epiphysenknorpel mit fast
 vollständigem Schwund der alkalischen Phosphatase. Nur
 am proximalen Rand der Knorpelplatte sind noch einige
 phosphatasehaltige Zellen (schwarz gefärbt) zu erkennen.

- b) Wie verhält sich die Enzymausrüstung der Zellpopulation, die die Bestrahlung überlebt hat und nach 2 - 3 Tagen auf die Zotten wandert.
- c) Wie verhält sich die alkalische Phosphatase des Zottenepithels im Regenerationsstadium (nach 4 - 6 Tagen) bei den Tieren, die die Bestrahlung überleben.

Um Artefaktmöglichkeiten weitgehend auszuschalten und einen vollständigen Überblick über den gesamten Dünndarm zu erhalten, haben wir eine Makromethode zur Enzymdarstellung angewandt. Dabei wird der aufgeschnittene Dünndarm in toto in der Substratlösung (Azofarbstoffmethode. Substrat: Alpha-Naphthyl-Phosphat. Echtblausalz-BB. pH 9,2) inkubiert. Man erhält damit eine gute Darstellung der alkalischen Phosphatase im Bürstensaum der Schleimhautzotten. Die Präparate werden sowohl makroskopisch als auch bei Lupenvergrößerung ausgewertet und die Befunde durch enzymhistochemische Untersuchungen am Schnittpräparat ergänzt.

Unsere Untersuchungen haben bisher zu folgenden Ergebnissen geführt:

- a) Es besteht ein deutlicher Aktivitätsgradient der alkalischen Phosphatase im Dünndarm, der von proximal nach distal abnimmt.
- b) In den untersuchten Dosisbereichen (1200 R, 1500 R, 2100 R und 4000 R) ist eine direkte Schädigung der alkalischen Phosphatase im Bereich des ausdifferenzierten Zottenepithels nicht zu erkennen. Die Enzymreaktion bleibt in den beiden ersten Tagen nach Bestrahlung praktisch unverändert. Gelegentlich ist sie etwas verstärkt und verwaschen.
- c) Nach Bestrahlung mit 1200 R (Bestrahlung des Abdomen) findet sich nach 3,5 - 4 Tagen ein Enzymschwund im Dünndarm, der besonders deutlich im Ileum ausgeprägt ist. Hier ist die Enzymreaktion negativ, mit Ausnahme einzelner noch enzymhaltiger Zotten über den Peyer'schen Plaques.

- d) 5 Tage nach der Bestrahlung ist die Enzymreaktion im Dünndarm wieder normal.

Da der Enzymschwund im Ileum besonders deutlich ausgeprägt ist, haben wir uns bei der histologischen Untersuchung zunächst auf diesen Darmabschnitt beschränkt und folgende Befunde erhoben:

- a) 3,5 - 4 Tage nach der Bestrahlung sind die Zotten verkürzt und mit atypischen Epithelzellen (vergrößerte, vielgestaltige, blass färbbare Zellkerne, Vakuolisierung des Cytoplasmas) bedeckt. In diesen Zellen ist auch mikroskopisch keine alkalische Phosphatase nachweisbar (Abbildung 3 und 4).
- b) Nach 2,5 Tagen findet man häufig Zotten, deren Epithelzellen in der oberen Zottenhälfte eine positive Enzymreaktion geben, während in der unteren Hälfte der Zotten das Enzym fehlt. Diese enzymnegativen Zellen gehören offenbar zu der Zellpopulation, die die Bestrahlung überlebt hat und auf die Zottenoberfläche wandert.
- c) Im Beginn der Regenerationsphase (am 4. Tag) ist das mikroskopische Enzymbild uneinheitlich. Vereinzelt findet man Zotten, deren Epithel im oberen Teil noch enzymfrei ist, während an der Zottenbasis wieder enzympositive Zellen auftreten. Häufig ist aber die Enzymreaktion im Bereich des Zottenepithels unregelmäßig verteilt. Dies spricht dafür, daß im Verlauf der gesteigerten Zellproliferation während der Regenerationsphase die enzymatische Ausdifferenzierung der Epithelzellen qualitativ und zeitlich uneinheitlich erfolgt.

3.233 Einfluß einer Ganzkörperbestrahlung (LD 50) auf die Enzymmuster der Milz bei verschiedenen Spezies

Ziel dieser Untersuchungen ist, mit Hilfe histochemischer Enzymreaktionen charakteristische Struktureinheiten und Zelltypen der Milzen verschiedener Spezies zu markieren und die Enzymmuster in den verschiedenen

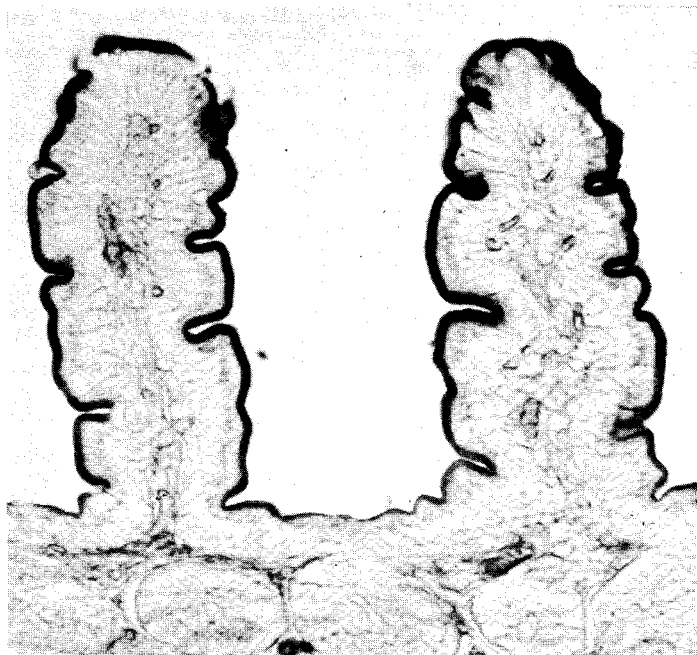


Abb. 3. Ileum einer normalen Maus. Darstellung der alkalischen Phosphatase mit einer Azofarbstoffmethode. Positive Enzymreaktion des Bürstensaumes (schwarz).

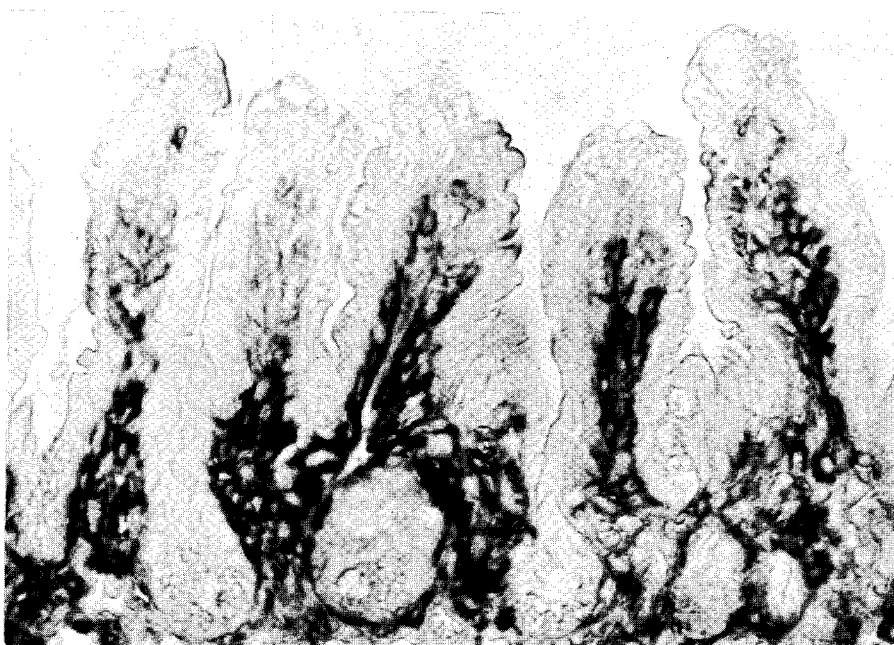


Abb. 4. Ileum einer Maus, 3,5 Tage nach Bestrahlung des Abdomen mit 1200 R. Die Zotten sind verkürzt. Die Zottenepithelien enthalten keine Phosphatase. Zunahme der Enzymaktivität im Zottenstroma.

Phasen nach der Bestrahlung (Destruktions-, Abräum- und Erholungsphase), in denen bekanntlich charakteristische Veränderungen der Zellpopulation auftreten, vergleichend zu untersuchen.

Die Untersuchungen werden an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen durchgeführt und folgende Enzyme histochemisch nachgewiesen:

Alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Adenosintriphosphatase, 5-Nukleotidase, unspezifische Esterase, Naphthol-AS-D-Esterase und DPNH-Diaphorase.

Die bisher erfolgte Auswertung der Präparate hat deutliche Speziesunterschiede der Enzymmuster der Milzen erkennen lassen.

Außerdem wurde festgestellt, daß es in der 6 - 12 Stunden nach Bestrahlung beginnenden Abräumphase zu einer deutlichen Vermehrung der sauren Phosphatase in den Milzschnitten kommt. Dies ist auf eine starke Proliferation von Reticulumzellen, bzw. Makrophagen, die sich durch einen auffallend starken Gehalt an saurer Phosphatase auszeichnen, zurückzuführen. Die vermehrte Enzymaktivität der Schnitte ist also auf eine Änderung der Zellpopulation zurückzuführen. Nach allgemeiner Erfahrung dürfte kein Zweifel bestehen, daß es sich bei dieser in Reticulumzellen und Makrophagen histochemisch nachweisbaren sauren Phosphatase um ein lysosomales Enzym handelt.

Zusammenfassung:

Durch eine Kombination statistischer und morphologischer Methoden wird die Pathogenese akuter und chronischer Strahlenschäden, insbesondere maligner Neubildungen, nach äußerer Bestrahlung und nach Inkorporation von Radionukliden untersucht. Mit dem Ziel, die Rolle der zeitlichen und räumlichen Dosisverteilung zu erfassen, werden vergleichende Studien mit Radiumisotopen verschiedener Halbwertszeit und Strahlen-

energie durchgeführt. Begonnen wurden strahlenphysikalische, metabolische und toxikologische Studien mit Ra 224 (Thorium X). Es wird über Ausscheidung, Retention und Organverteilung von Ra 224 und seiner Tochterprodukte bei Ratten berichtet. Dosis und Dosisleistung im Skelett nach Zufuhr von Ra 224 in Abhängigkeit von der Zeit wurden berechnet und mit dem Dosisverlauf nach Zufuhr von Ra 226 verglichen.

Außerdem wurde mit morphologischen und histochemischen Studien zur akuten Toxizität nach Inkorporation von Ra 224 begonnen.

Untersuchungen zur Pathogenese und Histochemie von Strahlenschäden nach Röntgenbestrahlung befassen sich mit:

der Enzymhistochemie des Knochens nach lokaler Röntgenbestrahlung des Kniegelenkes wachsender Ratten,

dem Verhalten der alkalischen Phosphatase in der Dünndarmschleimhaut der Maus nach Röntgenbestrahlung und

den Veränderungen der Enzymmuster der Milzen verschiedener Spezies nach Ganzkörperbestrahlung.

Zitierte Literatur

- BATEMAN, A.J.: Nature (London) 178, 1278 (1956)
- EHLING, U.: Strahlentherapie 125/1, 128 - 135 (1964)
- FOLLENIUS, E.: C.R. Soc. Biol. 146, 1776 - 1778 (1952)
- GANGLOFF H. und HUG O.: Reprint from Advances in Biolog.
a. Medical Physics, Vol. 10, 1- 90 (1965)
Academic Press Inc., New York
- HALEY and SNIDER: I. International Symposion Chicago
Reponse of the nervous system to ionizing
radiation. Churchill Ltd. London 1961
II. International Symposion Los Angeles
Reponse of the nervous system to ionizing
radiation. Churchill Ltd. London 1964
Symposion on the effects of ionizing
radiation on the nervous system, Vienna 1961
IAEA
- HICKS, S.P.: Amer. J. of Pathol. 33, 459 - 481 (1957)
- HUG, O.: Z. für Naturforschung, 19b/6, 541 - 543 (1964)
- LÜNING, K.G.: et al.: Nature 197, 304 - 305 (1963)
- KESSLER & LUTHER: Z. für vergl. Phys. 40, 492 - 528 (1957)
- RUGH, R.: Transaction of the New England Obstetrical
and Genet. Soc. 13, 15 - 25 (1959)
- RUSSELL, W.L., L.B. RUSSELL a. E.L. PHIPPS: Science 129,
1288 (1959)
- RUSSELL, W.L., L.B. RUSSELL a. E.M. KELLY: Science 128,
1546 (1958)
- RUSSELL, W.L., L.B. RUSSELL a. A.W. KIMBALL: Amer. Naturalist
88, 269 (1954)
- RUSSELL, L.B., W.L. RUSSELL: Journal of Cellular and Compa-
rative Phys., 43/1, 103 - 149 (1954)
- STOLK A.: Proefschrift, Druckerij en Uitgeverij G.W.
van der Wiel & Co. Arnheim, 1950
- UTAH-REPORT: Research in Radiobiology, Semi-annual Report
of the University of UTAH, Contract AT
(11-1)-119, March, 1964

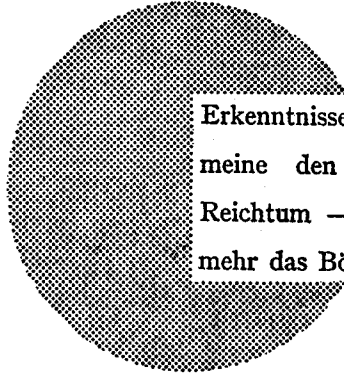
AN UNSERE LESER

Alle Euratom-Berichte werden nach Erscheinen in der von der Zentralstelle für Information und Dokumentation (CID) herausgegebenen Monatszeitschrift **EURATOM INFORMATION** angezeigt. Abonnements (1 Jahr : DM 60) und Probehefte sind erhältlich bei :

Handelsblatt GmbH
"Euratom Information"
Postfach 1102
D-4 Düsseldorf (Deutschland)

oder

Office central de vente des publications
des Communautés européennes
2, Place de Metz
Luxembourg



Erkenntnisse verbreiten ist soviel wie Wohlstand verbreiten — ich meine den allgemeinen Wohlstand, nicht den individuellen Reichtum — denn mit dem Wohlstand verschwindet mehr und mehr das Böse, das uns aus dunkler Zeit vererbt ist.

Alfred Nobel

VERTRIEBSSTELLEN

Alle Euratom-Berichte sind bei folgenden Stellen zu den auf der ersten Rückseite des Umschlags angegebenen Preisen erhältlich (bei schriftlicher Bestellung bitte die EUR-Nummer und den Titel, die beide auf der ersten Umschlagsseite jedes Bericht stehen, deutlich angeben).

OFFICE CENTRAL DE VENTE DES PUBLICATIONS DES COMMUNAUTES EUROPEENNES

2, place de Metz, Luxembourg (Compte chèque postal N° 191-90)

BELGIQUE — BELGIË

MONITEUR BELGE
40-42, rue de Louvain - Bruxelles
BELGISCH STAATSBLAD
Leuvenseweg 40-42 - Brussel

LUXEMBOURG

OFFICE CENTRAL DE VENTE
DES PUBLICATIONS DES
COMMUNAUTES EUROPEENNES
9, rue Goethe - Luxembourg

DEUTSCHLAND

BUNDESANZEIGER
Postfach - Köln 1

NEDERLAND

STAATSDRUKKERIJ
Christoffel Plantijnstraat - Den Haag

FRANCE

SERVICE DE VENTE EN FRANCE
DES PUBLICATIONS DES
COMMUNAUTES EUROPEENNES
26, rue Desaix - Paris 15^e

ITALIA

LIBRERIA DELLO STATO
Piazza G. Verdi, 10 - Roma

UNITED KINGDOM

H. M. STATIONERY OFFICE
P. O. Box 569 - London S.E.1

EURATOM — C.I.D.
51-53, rue Belliard
Bruxelles (Belgique)